

⑨ 日本国特許庁(JP)

⑩ 特許出願公開

⑪ 公開特許公報(A)

昭60-172291

⑫ Int. Cl.<sup>4</sup>

識別記号

庁内整理番号

⑬ 公開 昭和60年(1985)9月5日

C 12 P 7/52  
 //(C 12 P 7/52  
 C 12 R 1:145)

8213-4B

審査請求 未請求 発明の数 1 (全5頁)

⑭ 発明の名称 イソ酪酸の製造方法

⑮ 特 願 昭59-28558

⑯ 出 願 昭59(1984)2月20日

⑰ 発 明 者 井 上 耕 一 姫路市網干区新在家940  
 ⑰ 発 明 者 河 田 直 紀 姫路市余部区上余部500  
 ⑰ 発 明 者 藤 山 貞 夫 姫路市安田3-108-1  
 ⑱ 出 願 人 工業技術院長

## 明 細 書

## 1. 発明の名称

イソ酪酸の製造方法

## 2. 特許請求の範囲

二酸化炭素と水を基質として用いて、クロストリウム属に属し二酸化炭素と水を還元してイソ酪酸を生産する能力のある菌を培養し、生成蓄積されたイソ酪酸を回収する事を特徴とするイソ酪酸の製造方法

## 3. 発明の詳細な説明

(産業上の利用分野)

この発明は、クロストリウム属に属する菌を用いて二酸化炭素と水素とからイソ酪酸を製造する方法に関するものである。イソ酪酸は香料原料など合成化学の分野で用いられている。

(従来技術)

二酸化炭素と水素とを還元して、生育培地中に菌を蓄積する微生物はいくつか知られている。そのなかでクロストリウム属に属する菌は4種あるが、これらが二酸化炭素と水素とからイソ酪

酸を生産することは知られていない。

菌類を還元してイソ酪酸を製造する能力のある菌も知られており、クロストリウム属に属する菌としてはクロストリウム・スティ克蘭ディ、クロストリウム・プロビオニカム、クロストリウム・ゴーニなどがあるが、これらは二酸化炭素と水素を基質とするものではない。

(発明の目的)

本発明者は、再生可能な資源であり自然界において広く存在しかつ各種産業の最終の廃棄物でもある二酸化炭素に着目し、これを将来の有力なエネルギー源として考えられている水素と反応させることにより、生化学的にカルボン酸を製造する方法を検討しこの発明に到達した。上記のような菌が知られているものの、二酸化炭素と水素とからのカルボン酸の製造を工業的に実施するため、解決すべき問題はまだまだ多く、特に二酸化炭素と水素とを基質としてイソ酪酸を製造する能力のある菌はまだ知られていない。

本発明者はこのような事情のもとに、二酸化炭

## 特開昭60-172291(2)

炭と水素を基質とするイソ菌の新しい製造方法を提供することを目的とする。

## (発明の構成)

本発明は二酸化炭素と水素を基質として用いて、クロストリウム属に属し二酸化炭素と水素を還元してイソ菌を生産する能力のある菌を培養し、生成菌培養されたイソ菌を回収する事を特徴とするイソ菌の製造方法である。

本発明で用いられる微生物はクロストリウム属に属し二酸化炭素と水素を還元するイソ菌生産菌であり、この様な微生物は本発明実施例記載のものをはじめである。実施例で用いられた微生物は嫌気性菌で菌子を作る桿菌である点でクロストリウム属に属する菌であると考えられるが、二酸化炭素と水素で成育し、鞭毛のないことなど、後で詳しく記す菌性質において公知の同属菌と相違しており、新菌種であると考えられる。正式の種名はまだ付されていないので、本発明ではクロストリウム・エスピー No.68-2と表示する。次にクロストリウム・エスピー No.68-2

(以下本図と略記する)の菌製法および菌学的性質を示す。

## (菌製法)

本菌は大阪府の大和川の川底泥より下記の方法により分離した。すなわち第1表に示す液体培地5mlを試験管へ分注し凝固後、無菌グローブボックス中で約0.3gの土壌を添加し、アチルゴム栓で密栓後、気相を水素(67%)と二酸化炭素(33%)を含む酸素ガスに置換し、30℃で培養し、約3週間毎に植え替えを行った。2回液体培地で植え替えたのち、第1表の培地に寒天3%を加えた寒天培地を用いてロールチューブ法(メソッズ・イン・マイクロバイオロジー、3巻B、117頁(1969)アカデミック・プレス)により単菌分離し本菌を得た。

## (菌学的性質)

本発明の菌の菌学的性質を示す。この菌学的性質の検討には、「アンアエロブ・ラボラトリー・マニュアル(Anaerobe Laboratory Manual)第4版」(The V.I.P. Anaerobe Laboratory Virginia

a Polytechnic Institute and State University, Blacksburg(1972))および「バークス・マニュアル・オブ・デターミネイティブ・バクテリオロジー(Bergey's Manual of Determinative Bacteriology)第8版」「微生物の分類と同定」(長谷川武治著、学会出版センター)に記載されている方法、培地組成を用いた。

## (顕微鏡的所見)

1. 菌の形および大きさ：桿状もしくは2連の直桿菌。幅1.3-1.6μm、長さ4.5-4.8μm
2. 鞭毛：なし
3. 菌子：あり、ターミナル
4. グラム染色：陰性

## (培地組成)

第1表に例示する。

第1表

基本培地の組成(炭イオン水1l中)	
0.1%レザズリン	1ml
10%NH <sub>4</sub> Cl	10ml
1MKH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (pH7.0)	5ml
20%MgSO <sub>4</sub> ・7H <sub>2</sub> O	0.5ml
ビタミン溶液	20ml
ミネラル溶液	40ml
シス테인塩酸(1水塩)	0.5g
Na <sub>2</sub> S	0.25g
NaHCO <sub>3</sub>	10g
0.06%ブロムエタンスルホン酸ナトリウム	1ml
酵母エキス	0.2g
ビタミン溶液組成(mg/l)	
ビオチン	2
葉酸	2
ピリドキシン塩酸	10
チアミン塩酸	5

## 特開60-172291(3)

リボフラビン	5
ニコチン酸	5
パントテン酸Ca	5
ビタミンB12	0.01
D-アミノ安息香酸	5
チオクト酸	1
ミネラル成分組成 (g/l)	
ニトリロ3酢酸	0.25
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.1
MnSO <sub>4</sub> · 4H <sub>2</sub> O	0.28
NaCl	0.5
FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.05
CoCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	0.09
CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	0.07
ZnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.09
CuSO <sub>4</sub>	0.03
AlK(SO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> · 12H <sub>2</sub> O	0.009
H <sub>3</sub> BO <sub>4</sub>	0.005
NaMoO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	0.008

## (生育状態)

第1表の組成に3%寒天を加えた寒天培地で生育は次の通りである。

形状：円形

周縁：円形

隆起：わずかに隆起する

表面：円形

色調：白

## (生理的性質)

①. 酸素に対する態度：微性嫌気性

②. 生育の範囲 (pH) 至適pH: 7.7

生育pH: 5.5 ~ 8.0

(温度) 至適温度: 30℃

生育温度: 25 ~ 40℃

③. インドール産生: +

④. セラチンの消化: -

⑤. カタラーゼ産生: -

⑥. デンプンの加水分解: -

⑦. エスクリンの加水分解: -

⑧. 色素の生成: -

## (炭素源の同化性)

第1表の基本培地に下記炭素源(1%)を含む液体培地5mlを直径18mmの試験管に加え、無菌培地を作成し本菌を接種し気相を酸素(67%)と二酸化炭素(33%)を含む除菌ガスに置換し、30℃で14日間静置培養した。生育は600nmの波長を分光計(スペクトロニック20、島津製作所製)で測定した。600nmの波長が炭素源を含まないコントロールとの差が0.1未満のものを「同化しない」、0.1以上0.2未満のものを「わずかに同化する」、0.2以上のものを「同化する」とした。

同化するもの: グルコース、フラクトース、キシロース、リボース、アラビノース、ラムノース、ガラクトース、マルトース、シュクロース、ラクトース、メリビオース、トレハロース、セロビオース、ラフィノース、メレクトース、マンニトール

また上記の試験において酸素の代りに水素を用いた場合は二酸化炭素も同化する。

同化しないもの: ソルボース、ソルビトール、

メタノール、エタノール

## (糖などからの糖の生成)

第1表の基本培地に上記の試験で同化するものが検出された糖を1%添加し、気相を酸素(67%)と二酸化炭素(33%)を含む除菌ガスに置換し、本菌を接種、30℃で静置培養した。すべての炭素源において培地中には有糖類として糖類とイソ糖類が生産された。

またペプトン・酵母エキス培地またはペプトン・酵母エキス・グルコース培地を用いた場合も培地中には有糖類として糖類とイソ糖類が生産された。

## (在来の類似菌との比較など)

上記の菌学的性質から、No.68-2は、微性嫌気性のグラム陰性有菌子桿菌で、その主要菌部代謝産物が糖類とイソ糖類であることを特徴とする菌株である。この性状からパーワーズ・マニュアル・オブ・デターミネイティブ・バクテリオロジー第9版及びアンアエロブ・ラボラトリー・マ

## 特開昭68-172291(4)

第2表

C・スフェノイデス (文試験)	No. 68-2 (実試験)
形態： くさび形桿菌 単独もしくは2連 鞭毛あり	桿菌 単独もしくは2連 鞭毛なし
大きさ： 0.3~ 0.5 ( $\mu$ m) × 1.6~ 0.7	1.3~ 1.8 × 4.5~ 4.8
グラム染色： 陽性	陽性
酸素生産： なし	なし
炭素同化性	
リボース同化性： なし	よく同化する
メリビオース同化性： なし	よく同化する
メレプトース同化性： なし	よく同化する
生産物： 培養の後にエタノール、 プロパノールを生産する	酢酸の他にイソブタン を生産する

ニュアル第4版にもとず検索するとクロストリウム (Clostridium) に属する菌種であると考えられる。そこでアンアエロブ・ラボラトリー・マニュアル第4版で属の同定のキーに従って同定していくとクロストリウム・スフェノイデス (C. sphenoides) に行きあたる。またバーグズ・マニュアル・オブ・デターミネイティブ・バクテリオロジー第8版には菌性状が No. 68-2 と一致する菌種の記載はなかった。No. 68-2 とクロストリウム・スフェノイデスの性状を比較したところ共に偏性気性のグラム陽性有鞭毛桿菌である点で一致したが、第2表に示す点で両菌の性状は違っていた。本発明の菌種は、二酸化炭素と水素で成育して酢酸とイソブタンを生ずる。クロストリウム属に属する菌で二酸化炭素と水素で成育する菌は4種知られていたが、これらはすべて鞭毛を有し、また1種以外はグラム陰性である点で本発明とは区別できるものであった。

以上のことから、本菌種はクロストリウム属に属する新菌種であると考えられるので、クロストリウム・エスピー No. 68-2 と命名した。

さらにこの菌種は工業技術院微生物工業技術研究所に「菌工研菌寄第7367号 (FERM-P No. 7367) として寄託した。

## (培養方法)

培養方法は原則的には、一般の微生物の培養と同様であるが、酸素の侵入を防ぐことが必要であり、実質的には、ゴム栓等で密栓した培養瓶中で、静置あるいは攪拌する方法が用いられる。やや大きい規模では、通常用いられる發酵槽がそのまま利用でき、装置内の酸素は、窒素などの不活性気体あるいは酸素気体などで置換することにより嫌氣的な雰囲気をつくることが可能である。發酵槽の形式は特に問わないが、普通に使われる自作組合槽のほか、一段あるいは多段の気泡塔型、ドラフトチューブ型の發酵槽も利用できる。

培養に用いる炭素源は、通常、二酸化炭素ガスとして供給するが、培養中に溶解二酸化炭素あるいは炭酸塩、炭酸水素塩として加えることもできる。窒素源は酸化アンモニウムのごときアンモニウム塩や硝酸ソーダのような硝酸塩のごとき、通

常の菌種に用いられる各種の窒素化合物を用いることができる。

その他必要に応じ、リン酸二水素カリ、硫酸マグネシウム、硫酸マンガン、塩化ナトリウム、硫酸鉄、塩化コバルト、塩化カルシウム、硫酸亜鉛、硫酸銅、明ばん、モリブデン酸ソーダ、硫酸などの無機化合物、あるいはビオチンや酢酸エキスなどのビタミン類を添加することは、通常行なわれる通りである。

以下具体例により本発明を説明する。

## 実施例1

クロストリウム・エスピー No. 68-2 株を以下のように培養した。第1表に示す培地を試験管へ5 ml 分注し、同培地で培養を行った。培養液100  $\mu$  l を無気グローブボックス (ファーマ社、アナエロボックス) 中で振盪し、アチルゴム栓で密栓したのち気相を水素 (67%) と二酸化炭素 (33%) を含む酸素ガスに置換し、30℃で静置培養した。

培養液の一部を遠心分離機により菌体を分離し、

## 特開号60-172291(6)

この上物をリン酸で酸化した後、ガスクロマトグラフィーにより生成物の定量を行なった。

その結果、培養培養10日間で0.28g/lの酢酸と0.48g/lのイソ酢酸を生成していた。(生成物の定量はガスクロマトグラフ-質量分析計によった。)

## 実施例2

し字型試験管を用い、実施例1と同様に培養してクロストリウム・エスビー No.68-2株の培養培養を行なった。測定方法も実施例1と同様に行ない生成物を分析した結果10日間で0.42g/lの酢酸と0.52g/lのイソ酢酸を生成していた。

特許出願人 工業技術院長